



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**MORGANA MUNIZ CARRIJO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS E SASHIMIS**  
**COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADOS E PADARIAS DO DISTRITO**  
**FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

MORGANA MUNIZ CARRIJO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS E SASHIMIS  
COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADOS E PADARIAS DO DISTRITO  
FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do grau de Bacharel  
em Farmácia, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Coorientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC316a Carrijo, Morgana Muniz  
Avaliação da qualidade microbiológica de sushis e sashimis  
comercializados em supermercados e padarias do Distrito  
Federal / Morgana Muniz Carrijo; orientador Daniela  
Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da  
Silva. -- Brasília, 2019.  
37 p.

Monografia (Graduação - Bacharel em Farmácia) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Sushi. 2. Sashimi. 3. Salmonella enterica. 4.  
Qualidade higienicossanitária. 5. Distrito Federal. I.  
Orsi, Daniela Castilho, orient. II. da Silva, Izabel  
Cristina Rodrigues, co-orient. III. Título.

MORGANA MUNIZ CARRIJO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS E SASHIMIS  
COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADOS E PADARIAS DO DISTRITO  
FEDERAL**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Mestranda Lorena Cristina Fernandes Messias da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado essa oportunidade e por tudo que me proporcionou viver durante esses anos de graduação. A todos os docentes, pelo aprendizado e pelos anos de caminhada juntos. A minha coorientadora, Isabel Cristina Rodrigues da Silva, que dedicou o seu tempo e me ajudou na conclusão deste trabalho. Meu profundo agradecimento a minha professora orientadora, Daniela Castilho Orsi, pelo empenho e tempo dedicados para o meu projeto de pesquisa e por todo apoio, paciência e ensinamentos ao longo da elaboração deste projeto.

Meus agradecimentos a minha família, principalmente a minha mãe, Maria do Socorro, que é essencial na minha vida e que sempre me incentivou a nunca desistir e a ser uma pessoa melhor. Ao meu irmão e a minha cunhada, Rander e Nathália, que sempre estiveram ao meu lado e ao meu namorado, Lucas, pelo apoio e compreensão. E aos amigos que fiz durante a graduação, Luciana, Ísis, Ivan, Amanda e Fernanda, todos esses anos não teriam graça sem eles.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de sushis e sashimis comercializados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias na cidade de Brasília e região. Para as análises microbiológicas, foram coletadas 7 amostras no total, sendo 3 amostras de sushis e 4 amostras de sashimis. As análises bacteriológicas realizadas foram: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp. A genotipagem através da técnica de PCR foi realizada para confirmação dos microrganismos *S. aureus* e *S. enterica*. Os resultados mostraram que das 4 amostras de sashimi analisadas 3 amostras apresentaram *Salmonella* entérica (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*) e, portanto, estavam impróprias para o consumo. Todas as amostras estavam contaminadas com bactérias *S. aureus*, porém as contagens que variaram de 2,26 a 2,99 log UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença desta bactéria indica principalmente falta de higiene da parte do manipulador, visto que esta é encontrada na pele e nas fossas nasais de seres humanos. A presença de *Salmonella* entérica nas amostras de sashimi evidencia problemas higienicossanitários no processos de produção, processamento e comercialização desse alimento, pois a bactéria *Salmonella* spp. não faz parte da microbiota natural do peixe e sua presença pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou pelo contato do pescado com águas contaminadas com esgoto e material fecal, representando uma via de transmissão dessas bactérias.

**Palavras-chave:** sushi, sashimi, qualidade higiênicossanitária, *Salmonella enterica*

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological quality of sushis and sashimis marketed in establishments not specialized in Japanese cuisine such as supermarkets and bakeries in the city of Brasília and region. For the microbiological analyzes, 7 samples were collected in total, being 3 samples of sushis and 4 samples of sashimis. The bacteriological analyzes were: total counting of mesophilic and psychrotrophic microorganisms, determination of the most probable number of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. research. Genotyping using the PCR technique was performed to confirm *S. aureus* and *S. enterica* microorganisms. The results showed that of the 4 sashimi samples analyzed 3 samples showed *Salmonella enterica* (genetically confirmed through the presence of the *invA* gene) and therefore were unfit for consumption. All samples were contaminated with *S. aureus* bacteria, however counts ranging from 2.26 to 2.99 log CFU / g were within the limits allowed by legislation. The presence of this bacterium indicates mainly lack of hygiene on the part of the manipulator, since this bacterium is found in the skin and in the nasal cavities of humans. The presence of *Salmonella enterica* in the sashimi samples shows hygienic and sanitary problems in the production, processing and commercialization of this food, because the bacterium *Salmonella* spp. is not part of the fish's natural microbiota and its presence may be justified by inadequate handling at the stages of the production chain or by the contact of the fish with water contaminated with sewage and fecal material, representing a route of transmission of these bacteria.

**Keywords:** sushi, sashimi, hygienic sanitary quality, *Salmonella enterica*

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 111 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 16  |
| 2.1 Objetivo geral .....                                    | 16  |
| 2.2 Objetivos específicos .....                             | 17  |
| 3. JUSTIFICATIVA.....                                       | 17  |
| 4. RESUMO .....   | 18  |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS.....                                  | 21  |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                              | 24  |
| 7. CONCLUSÃO .....  | 29  |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO .....               | 30  |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA..... | 33  |



## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Nuc</i> e <i>invA</i> ..... | <b>23</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Análises microbiológicas das amostras de sushis e sashimis.....  | <b>25</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Análises moleculares das amostras de sushis.....   | <b>28</b> |

## LISTA DE ANEXOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo 2.</b> Normas de submissão para a Revista Higiene Alimentar..... | <b>38</b> |
|---|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

FA – Ágar Fenilalanina

g – Gramas

°C - Grau Celsius

h – Horas

ICMSF - Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos

KCl - Cloreto de potássio

LIA – Ágar Lisina Ferro

log – Logaritmo decimal

µL - Microlitro

min - Minuto

mL - Mililitro

NMP - Número Mais Provável

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

seg – Segundo

TSI – Três Açúcares e Ferro

UFC – Unidade Formadora de Colônia

XLD – Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Culinária japonesa e o consumo de sushi e sashimi no Brasil

A alimentação é de extrema importância para o ser humano, não só por razões biológicas, mas por aspectos psicológicos, políticos, científicos, sociais, econômicos e culturais, sendo fundamental na dinâmica da evolução das sociedades (PROENÇA, 2010). Nos dias de hoje, com a globalização ocorrem cada vez mais trocas de informação, tecnologia e cultura entre os países. A gastronomia também está envolvida nesse processo e a comida japonesa se expandiu nos países ocidentais e tornou-se frequente em restaurantes em todo o mundo (PATROCÍNIO, 2009; PROENÇA, 2010).

Os imigrantes japoneses chegaram ao Brasil há mais de 100 anos e nos dias de hoje o número de brasileiros com ascendência japonesa é de aproximadamente 1,5 milhão, de acordo com o Consulado Geral do Japão em São Paulo (BRASIL, 2017). A busca por um padrão alimentar saudável favorece o consumo de pratos japoneses, pois os mesmos são coloridos, com grande variedade de vegetais e pouca ou nenhuma cocção, o que ajuda na preservação do valor nutritivo dos alimentos (RODRIGUES et al., 2012; CWIERTKA, 2005).

Os dois alimentos que mais se destacam na culinária japonesa são o sushi e o sashimi. O sushi geralmente é composto pelo arroz japonês avinagrado, contendo cobertura ou recheio de peixes geralmente crus e vegetais. O tipo mais comum de apresentação do sushi é um bolinho de arroz moldado manualmente, temperado com vinagre, sal e açúcar enrolado externamente com folha de alga marinha denominada *nori* e contendo como recheio peixes, legumes, frutas ou ovos (LORENTZEN et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

A palavra sashimi significa “carne cortada”. O sashimi consiste de peixes e frutos do mar frescos, crus, cortados em fatias finas. No Brasil os peixes mais utilizados para a elaboração de sashimi são: salmão, atum e anchova (pescado de água salgada), além da tilápia (pescado de água doce). O pescado destinado à elaboração do sashimi deve ser fresco e não pode ser submetido ao congelamento, podendo apenas ser resfriado visando ao retardo do desenvolvimento microbiano (HAMADA-SATO et al. 2005; YANO et al. 2004).

A descoberta de que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados reduz o risco de doenças cardíacas tem contribuído para uma mudança nos perfis e hábitos alimentares, fazendo com que os brasileiros aumentem o consumo de peixes. Na composição, os pescados contêm vitaminas lipossolúveis A e D e minerais como cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio, tornando-se um alimento destaque no quesito nutricional. As carnes dos peixes são uma ótima opção por serem ricas em proteínas e ácidos graxos insaturados (BARTOLOMEU et al, 2011; LOTTENBERG, 2009).

Segundo o IBGE (2016), a produção nacional de peixes em 2016 foi de 507,12 mil toneladas, um aumento de 4,4% em relação ao ano anterior, com um crescimento da aquicultura brasileira, a qual atingiu um valor de produção de R\$ 4,61 bilhões. O aumento do consumo de peixes pelo brasileiro está diretamente relacionado com a qualidade do pescado e o aumento da oferta no mercado interno (GERMANO & GERMANO, 2008)

Os restaurantes especializados em culinária japonesa, anteriormente restritos às regiões onde predominavam os imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns, estando hoje presentes em quase todos os *shoppings* dentro da categoria dos *fast food* (HIRATA, 2007). Associando tal informação com a introdução da culinária japonesa em estabelecimentos não especializados, como churrascarias e bufês *self servisse* com preparações variadas, entende-se ainda melhor por que cresce a cada dia o número de adeptos dos sushis e sashimis (PROENÇA, 2010).

Assim, a culinária japonesa é uma das principais responsáveis pelo aumento do consumo de pescado cru no Brasil. Contudo, é necessário dar importância para a qualidade do pescado, bem como para suas etapas de preparo e para o estabelecimento no qual se está comprando, para garantir que esses alimentos prontos para o consumo ofereçam segurança alimentar ao consumidor.

## **1.2 Qualidade microbiológica dos sushis e sashimis**

A preocupação com a segurança alimentar de alimentos como sushi e sashimi é grande, principalmente pelo fato desses alimentos serem perecíveis e consumidos sem processamento térmico, requerendo condições higiênico-sanitárias

adequadas para seu preparo. A contaminação dos sushis e sashimis pode ocorrer tanto na matéria prima, como durante o processamento, sendo de grande importância o uso de técnicas corretas de manipulação (RODRIGUES et al., 2012; VALLANDRO et al., 2011).

Para a obtenção de uma matéria prima de qualidade é necessário que se tenha um tratamento adequado do pescado, desde a sua captura, ainda nos barcos pesqueiros, até chegar ao consumidor, após ter passado pelas fases de processamento, manipulação e transporte em condições higiênicas. A matéria prima de boa qualidade é essencial para a segurança dos sushis e sashimis, pois a microbiota do pescado reflete a água onde ele vive. O lançamento de esgotos sem tratamento nas águas de lagos, rios e mar contamina o pescado com bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* (ICMSF, 2005).

A falta de boas práticas de higiene na cadeia produtiva dos sushis e sashimis pode resultar na contaminação por bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos. As boas práticas evitam a degradação indesejada da matéria-prima, assim como manter a temperatura de refrigeração adequada em todas as fases, lavar bem as mãos antes da manipulação, fazer uso de água filtrada e sempre manter a qualidade microbiológica do gelo, pois ele tem a finalidade de conservar os peixes e evitar a sua contaminação (RODRIGUES et al., 2012; VALLANDRO et al., 2011; VIEIRA et al., 2007).

Na elaboração dos sushis e sashimis, o pescado tem de ser fresco e não deve ser congelado, sendo obrigatoriamente resfriado com o objetivo de desacelerar o crescimento de microrganismos. Outro fator preocupante é o uso dos vegetais crus nos recheios dos sushis. Os vegetais, que por muitas vezes acompanham os pratos, oferecem beleza e uma refeição mais balanceada, mas também podem apresentar consigo microrganismos patogênicos, os quais podem ser provenientes do solo, de águas contaminadas e da má higienização. Assim, esses vegetais aumentam as possibilidades de contaminação, pois erros quanto à higienização e manipulação podem veicular microrganismos patogênicos (LORENTZEN et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), os alimentos prontos para o consumo (como é o caso do sushi e sashimi) são um dos principais responsáveis por surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos

(DTA) no país. Dentre os fatores que contribuem para ocorrência de surtos de DTA, destaca-se: a falta de higiene pessoal dos manipuladores, a contaminação cruzada, a limpeza inadequada dos utensílios e a utilização de matéria prima de má qualidade.

### **1.3 Legislação brasileira e limites microbiológicos para sushis e sashimis**

A RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano e define no item 22b do anexo I (Pratos Prontos para Consumo à base de carnes, pescados e similares crus como quibe cru, carpaccio, sushi e sashimi), as seguintes análises: coliformes termotolerantes; *Salmonella* spp., estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*) e *Vibrio parahaemolyticus* (BRASIL, 2001).

A contaminação do pescado com microrganismos de origem fecal está relacionada com a presença de *Escherichia coli*, principal coliforme termotolerante, considerado o mais específico indicador de contaminação fecal. O microrganismo *E. coli* possui linhagens patogênicas que são agrupadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* aderente-difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Sua pesquisa é de suma importância para a saúde pública, pois cepas enteropatogênicas podem causar diarreia e vômito e cepas toxigênicas, como a *E. coli* O:157H7, podem causar síndrome urêmica hemolítica (WHO, 2011).

O pescado contaminado com bactérias *Salmonella*, tanto de origem humana (*S. typhi* e *S. paratyphi*), quanto às de origem animal, bem como o gênero *Shigella*, refletem o resultado de águas poluídas por esgotos (ICMSF, 2005). Bactérias do gênero *Salmonella* estão amplamente distribuídas na natureza, seus principais reservatórios naturais são o trato intestinal de mamíferos, aves e répteis. Podem alcançar o ambiente aquático através da contaminação fecal e, desta forma serem detectadas em peixes e produtos pesqueiros (FRANCO & LANDGRAF, 2008; VIEIRA et al., 2004).

O *Staphylococcus aureus* apresenta grande importância em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos por ser um dos mais frequentes causadores de surtos de intoxicação alimentar. A intoxicação causada pelo *S. aureus* é desencadeada pelo consumo de enterotoxinas que são produzidas por esta bactéria durante seu processo de multiplicação no alimento. A presença de *S. aureus* no pescado ocorre, predominantemente, por meio da manipulação (GERMANO & GERMANO, 2008; VIEIRA et al., 2004).

A bactéria *Staphylococcus aureus* habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica. O patógeno é encontrado em 30% da população humana e um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas, produtoras de toxina proteica termoestável (BENNETT, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As autoridades sanitárias devem garantir a qualidade dos produtos in natura para a população, sendo a qualidade higiênico-sanitária de extrema importância para a saúde das pessoas que consomem esses pratos, visto que sushis e sashimis tem potencial de serem transmissores de agentes causadores de infecções e intoxicações alimentares, por serem bastante manipulados e não receberem nenhum tratamento térmico. Pacientes de risco, como, mulheres grávidas, idosos, imunodeprimidos ou que tenham doenças crônicas devem coibir-se de tal consumo. (MONTANARI, 2015; OLIVEIRA, 2012; RODRIGUES, 2012).

#### **1.4 Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas**

As doenças causadas por alimentos são um grande problema de saúde pública. Dessa forma, para a detecção de microrganismos patogênicos são utilizados métodos analíticos microbiológicos convencionais e mais recentemente também está sendo bastante empregado o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os métodos moleculares estão sendo empregados com a finalidade de triagem e confirmação para diagnóstico microbiológico de espécies causadoras de toxinfecções (DICKEL et al., 2005).

O diagnóstico molecular via PCR é de fácil aprendizagem e representa um aumento da confiabilidade e da especificidade e redução do tempo de análise. Ele vem ganhando destaque dentre os demais métodos e tem como objetivo amplificar sequências de DNA, sendo capaz de detectar uma cópia de DNA de qualquer célula (RODRIGUES et al., 2011). Também é uma forma de detectar as amostras falso-negativas e células consideradas viáveis, mas não cultiváveis (TEODORO et al., 2006).

A PCR é uma técnica in vitro utilizada para amplificar enzimaticamente, de forma exponencial, um fragmento específico de DNA, através de uma série de ciclos repetitivos de reação (POWLEDGE 2004). Ela possui diferentes aplicações dependendo do que nos interessa investigar. Com base nisso, podemos dividi-la em duas categorias. A primeira é para a amplificação de um único sítio conhecido do genoma (locus), devendo-se conhecer a sequência com que está sendo trabalhada. Com esse tipo de PCR é possível fazer filogenias (ASUAR 2007).

Já na segunda não é necessário conhecer a região que se está amplificando, sendo chamada de zona hipervariável do genoma, portanto o tamanho do fragmento esperado não é conhecido. Vários locus são observados concomitantemente e as informações das zonas variáveis permitem compreender os dados necessários para a análise genética de populações. Ele é utilizado para determinar o polimorfismo genômico, sendo o mais comum para impressão digital (ASUAR 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de sushis e sashimis comercializados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias na cidade de Brasília e região.



## 2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* sp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* sp.

## 3.JUSTIFICATIVA

A preocupação com a segurança alimentar de alimentos como sushi e sashimi é grande, principalmente pelo fato desses alimentos serem perecíveis e consumidos sem processamento térmico, requerendo condições higiênico-sanitárias adequadas para seu preparo. A contaminação dos sushis e sashimis pode ocorrer tanto na matéria prima, como durante o processamento, sendo de grande importância o uso de técnicas corretas de manipulação. As análises microbiológicas das amostras de sushis e sashimis coletados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias poderão determinar a sua qualidade, de forma a verificar se esses alimentos prontos para consumo estão sendo comercializados nesses estabelecimentos com segurança alimentar para o consumidor.

#### **4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SUSHIS E SASHIMIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

MORGANA MUNIZ CARRIJO, IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA,  
DANIELA CASTILHO ORSI

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de  
Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

#### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de sushis e sashimis comercializados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias na cidade de Brasília e região. Para as análises microbiológicas, foram coletadas 7 amostras no total, sendo 3 amostras de sushis e 4 amostras de sashimis. As análises bacteriológicas realizadas foram: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrótrófos, determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp. A genotipagem através da técnica de PCR foi realizada para confirmação dos microrganismos *S. aureus* e *S. enterica*. Os resultados mostraram que das 4 amostras de sashimi analisadas 3 amostras apresentaram *Salmonella* entérica (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*) e, portanto, estavam

impróprias para o consumo. Todas as amostras estavam contaminadas com bactérias *S. aureus*, porém as contagens que variaram de 2,26 a 2,99 log UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença desta bactéria indica principalmente falta de higiene da parte do manipulador, visto que esta é encontrada na pele e nas fossas nasais de seres humanos. A presença de *Salmonella* entericanas amostras de sashimi evidencia problemas higienicossanitários no processos de produção, processamento e comercialização desse alimento, pois a bactéria *Salmonella* spp. não faz parte da microbiota natural do peixe e sua presença pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou pelo contato do pescado com águas contaminadas com esgoto e material fecal, representando uma via de transmissão dessas bactérias.

**Palavras-chave:** sushi, sashimi, qualidade higiênicossanitária, *Salmonella* enterica

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological quality of sushis and sashimis marketed in establishments not specialized in Japanese cuisine such as supermarkets and bakeries in the city of Brasília and region. For the microbiological analyzes, 7 samples were collected in total, being 3 samples of sushis and 4 samples of sashimis. The bacteriological analyzes were: total counting of mesophilic and psychrotrophic microorganisms, determination of the most probable number of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. research. Genotyping using the PCR technique was performed to confirm *S. aureus* and *S. enterica* microorganisms. The results showed that of the 4 sashimi samples analyzed 3 samples showed *Salmonella enterica* (genetically confirmed through the presence of the *invA* gene) and therefore were unfit for consumption. All samples were contaminated with *S. aureus* bacteria, however counts ranging from 2.26 to 2.99 log CFU / g were within the limits allowed by legislation. The presence of this bacterium indicates mainly lack of

hygiene on the part of the manipulator, since this bacterium is found in the skin and in the nasal cavities of humans. The presence of *Salmonella enterica* in the sashimi samples shows hygienic and sanitary problems in the production, processing and commercialization of this food, because the bacterium *Salmonella* spp. is not part of the fish 's natural microbiota and its presence may be justified by inadequate handling at the stages of the production chain or by the contact of the fish with water contaminated with sewage and fecal material, representing a route of transmission of these bacteria.

**Keywords:** sushi, sashimi, hygienic sanitary quality, *Salmonella enterica*

## INTRODUÇÃO

A descoberta de que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados reduz o risco de doenças cardíacas tem contribuído para uma mudança nos hábitos alimentares, fazendo com que os brasileiros aumentem o consumo de peixes. A culinária japonesa é uma das principais responsáveis pelo aumento do consumo de pescado cru no Brasil (PROENÇA, 2010).

Os dois alimentos que mais se destacam na culinária japonesa são o sushi e o sashimi. O sashimi consiste em fatias de peixe ou pescado cru, de várias espécies, servidas com molho de soja e pasta de raiz forte, denominada *wassabi*. Entende-se por sushi o alimento pronto para o consumo preparado com arroz cozido e acidificado com vinagre, recheado com peixes geralmente crus e vegetais (MUSCOLINO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012; VALANDRO et al., 2011).

O pescado cru apresenta excelente composição nutricional, no entanto, a carne de peixe é considerada um dos alimentos proteicos mais fáceis de sofrer deterioração. Na produção de sashimi deve-se trabalhar com peixes de ótima qualidade e de procedência conhecida; além disso, deve-se ter cuidado com a manipulação do produto para que não se contamine o pescado uma vez que o mesmo é consumido cru. O pescado destinado à elaboração do sashimi deve ser fresco e não pode ser submetido ao congelamento, podendo apenas ser resfriado

visando ao retardo do desenvolvimento microbiano. Por isso, a captura, manipulação e conservação desse pescado em baixas temperaturas é essencial para manutenção da qualidade (FRANCO & LANDGRAF, 2008; GERMANO & GERMANO, 2008).

O pescado está sujeito à contaminação pelos mais variados microrganismos, adquiridos já no ambiente aquático ou durante as diferentes etapas de captura, transporte, processamento e distribuição. Algumas bactérias patogênicas podem estar presentes na água, como, por exemplo, *Vibrio* sp. Ambientes aquáticos poluídos por esgoto acabam sendo contaminados com patógenos de trato gastrointestinal animal e humano, como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* (ICMSF, 2005). E a manipulação inadequada durante o preparo pode introduzir no alimento *Staphylococcus aureus* de origem humana, produtor de toxina estafilocócica (GERMANO & GERMANO, 2008; SILVA et al., 2008).

Assim, o pescado pode ser uma via de transmissão de doenças para o homem (Doenças Transmitidas por Alimentos) e o consumo do pescado sob a forma crua é ainda mais preocupante pelo fato desse alimento ser bastante manipulado e não receber nenhum tratamento térmico antes do consumo (BARTOLOMEU et al, 2011, ECHEVENGUA et al., 2008). Portanto o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de sushis e sashimis comercializados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias na cidade de Brasília e região.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas**

Para as análises microbiológicas, foram coletadas 7 amostras no total, sendo 3 amostras de sushis e 4 amostras de sashimis. As amostras estavam em embalagens dispostas em balcões refrigerados de supermercados e padarias de 3 diferentes estabelecimentos comerciais do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de

Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas.

Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até  $10^{-3}$ ).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C  $\pm$  1°C por 7-10 dias para bactérias psicrotróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lactosado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g.

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de gram. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetrationato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). As colônias com característica típica de *Salmonella* spp. foram repicadas nos meios bioquímicos LIA (Lysina Iron Agar) e FA (fenilalanina Agar) e incubadas na estufa bacteriológica entre 18-24 h.

## 5.2 Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* e *S. entérica* foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 105 pares de base referente ao gene *Nuc*. Para a identificação de *S. entérica* foi utilizado o fragmento de 103 pares de base referente ao gene *invA*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Sec* e *invA*

| Primer              | Sequência 5' - 3'       | Produto amplificado | Espécie            |
|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Sec</i> forward  | TTTACACCCAACGTATTAGCAGA |                     |                    |
| <i>Sec</i> reverse  | TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC  | 401 pb              | <i>S. aureus</i>   |
| <i>invA</i> forward | GCTGATGCCGGTGAAATTAT    |                     |                    |
| <i>invA</i> reverse | TGTCACCGTGGTCCAGTTTA    | 103 pb              | <i>S. enterica</i> |

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* ou *Salmonella* spp. foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusione incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pbDNAI/HindIII (JENA®).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta as análises microbiológicas das amostras de sushis e sashimis analisadas neste estudo. É importante a realização de análises microbiológicas dos alimentos prontos para o consumo como os sushis e sashimis para conhecer as condições de higiene em que esses alimentos foram preparados, para verificar se estes terão a vida útil pretendida e se podem oferecer algum risco a saúde do consumidor (FRANCO e LANDGRAF, 2008).



**Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de sushis e sashimis**

| Amostras | Bactérias mesófilas (log UFC/g) | Bactérias psicrotróficas (log UFC/g) | Coliformes totais (log NMP/g) | Coliformes termotolerantes (log NMP/g) | <i>Salmonella enterica</i> | <i>S. aureus</i> (log UFC/g) |
|----------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|------------------------------|
| 1 * SSPD | 3,37±0,18                       | 5,28 ±0,10                           | 0,86±0,00                     | ND                                     | Ausente                    | 2,72 ±0,20                   |
| 2 * PASA | 5,45±0,65                       | 6,21±0,15                            | <b>3,04±0,00</b>              | 0,58±0,18                              | <b>Presente</b>            | 2,26±0,24                    |
| 3 * PDSA | 2,39±2,08                       | 4,71±0,15                            | 0,58±0,18                     | 0,50±0,04                              | <b>Presente</b>            | 2,60±0,00                    |
| 4 * PVSA | 6,50±0,48                       | <b>7,07±0,07</b>                     | 2,80±0,41                     | 0,48±0,00                              | <b>Presente</b>            | 2,30 ***                     |
| 5 **PASU | 5,34±0,33                       | 4,99±0,22                            | 2,85±0,33                     | 0,58±0,17                              | Ausente                    | 2,99±0,21                    |
| 6**PDSU  | 3,25±0,32                       | 4,57±0,31                            | 1,00±0,55                     | 0,48±0,00                              | Ausente                    | 2,46±0,40                    |
| 7**PVSU  | 5,75±0,88                       | 5,66±0,78                            | 2,69±0,33                     | 0,61±0,22                              | Ausente                    | 2,92±0,10                    |

\*sahimi; \*\*sushi; \*\*\* = não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas uma bateria de tubos ou uma placa apresentou resultados positivos; ND = não detectado.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não tem um padrão estabelecido para os limites de contagem dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos, mas, segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002), os microrganismos mesófilos e psicrotróficos são um dos indicadores microbiológicos da qualidade em alimentos mais frequentemente utilizados e tem uma contagem máxima permitida de 7,0 log UFC/g.

As bactérias mesófilas possuem um crescimento ótimo entre 25 a 40°C e sua presença em baixas quantidades indica que a manipulação e as condições de conservação dos alimentos foram adequadas (LIBRELATO et al, 2005). Os microrganismos psicrotróficos são aqueles que apresentam crescimento ótimo em temperaturas abaixo de 20°C e possuem influência sobre os caracteres organolépticos do pescado (LIBRELATO et al, 2005), além de serem seus principais deterioradores (BARTOLOMEU et al, 2011).

Neste estudo, com exceção da amostra 4, as contagens de bactérias mesófilas e psicotróficas ficaram abaixo de 6,5 log UFC/g, estando de acordo com os limites microbianos considerados aceitáveis para o consumo. A amostra 4 de sashimi apresentou elevada contagem de psicotróficos de 7,07 log UFC/g, podendo ser considerado um produto insatisfatório para consumo de acordo com ICMSF (2002). Segundo FORSYTHE (2002) contagens totais acima de 7,0 log UFC/g indicam um produto em início de deterioração e com a qualidade comprometida.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais nos sushis e sashimis. Porém é importante quantificar esse grupo, pois essas bactérias costumam ter seus níveis aumentados em alimentos manipulados, e dessa forma, funcionam como um indicador de higiene na manipulação (MONTANARI et al., 2015). Para coliformes termotolerantes é permitida a presença de até 2,0 log NMP/g. Caso seja determinada a presença de *E. coli*, deve constar no laudo analítico.

A amostra 2 de sashimi teve elevada enumeração de coliformes totais (3,04 log NMP/g). Com exceção da amostra 1, todas as amostras apresentaram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes, mas a enumeração que variou de 0,48 a 0,61 log NMP/g foi baixa e estava dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira. Não houve isolamento de bactérias *E. coli* para identificação por PCR.

A pesquisa de *Salmonella* spp. é importante para a saúde pública por ser considerada a principal causa de doença entérica de origem bacteriana no ser humano (GATTI JUNIOR, 2011). O trato intestinal dos animais é o principal habitat das salmonelas e a contaminação dos alimentos se dá através das fezes dos animais ou de pessoas portadoras da bactéria, fômites ou águas contaminadas (CARVALHO, 2006). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostras de sushis e sashimis. A salmonelose normalmente é causada pelo consumo de carne crua ou inadequadamente cozida e a presença de *Salmonella* está mais relacionada com a incidência no animal vivo do que com a falta de higiene e por esse motivo não pode ser totalmente evitada somente pelas boas práticas de higiene (ICMSF, 2002).

Neste estudo nenhuma das amostras de sushi estavam contaminadas com *Salmonella* spp., no entanto das 4 amostras de sashimi analisadas 3 amostras

apresentaram *Salmonella* entérica (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*) e, portanto, estavam impróprias para o consumo.

No estudo de BRAGHINI et al. (2015), as análises de 15 amostras de *sashimis* coletadas de cinco restaurantes da cidade de Maringá, PR, revelaram que 3 amostras tiveram resultados positivos para *Salmonella* sp., sendo consideradas inadequadas para o consumo. No estudo de MALAVOTA et al. (2009), pôde-se constatar a presença de *Salmonella* sp. em oito das 64 amostras de *sashimis* analisadas (12,5% das amostras coletadas de 2 restaurantes da cidade do Rio de Janeiro, RJ).

A presença de bactéria *Salmonella* spp. no pescado cru evidencia problemas higienicossanitários no processos de produção, processamento e comercialização desse pescado, pois a bactéria *Salmonella* spp. não faz parte da microbiota natural do peixe e sua presença pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou pelo contato do pescado com águas contaminadas com esgoto e material fecal, representando uma via de transmissão dessas bactérias (AMAGLIANI et al., 2012; GUIA et al., 2018; LINDER et al., 2011).

Os valores máximos permitidos para contagem de *S. aureus* em amostras de sushis e *sashimis* na legislação brasileira são de 3,7 log UFC/g (BRASIL, 2001). *S. aureus* são bactérias mesófilas, capazes de produzir enterotoxinas, as quais podem causar intoxicações nos homens quando ingeridas. O pescado pode ser contaminado por essas bactérias tanto pela manipulação incorreta, pois essa bactéria pode estar presente nas mãos e mucosas oro-nasal dos manipuladores, quanto pela contaminação do ambiente (MONTANARI et al., 2015)

Neste estudo todas as amostras estavam contaminadas com bactérias *S. aureus*, porém as contagens que variram de 2,26 a 2,99 log UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A intensa manipulação dos sushis e *sashimis* e a qualidade da matéria prima são os fatores que propiciam a contaminação com *S. Aureus* (VALANDRO et al., 2011).

Hábitos de higiene pessoal durante a manipulação e comercialização, tais como lavagem das mãos, uso de máscaras e ausência de objetos de adorno são medidas que podem contribuir para a obtenção de produtos de melhor qualidade microbiológica (GERMANO e GERMANO, 2008). De acordo com VALANDRO et al. (2011), o treinamento dos manipuladores observado em seu estudo corroborou com

a baixa contagem de estafilococos encontrada nos sashimis, provavelmente por reflexo de uma higiene pessoal apropriada.

Por meio das análises moleculares foram confirmadas as colônias de *S. aureus* e *Salmonella enterica* nas amostras analisadas, conforme descrito na tabela 3.

**Tabela 3. Análises moleculares das amostras de sushi**

| Amostras | Bactéria e gene amplificado na PCR |                            |
|----------|------------------------------------|----------------------------|
|          | <i>S. aureus</i>                   | <i>Salmonella enterica</i> |
| 1        | <i>Sec</i>                         | -                          |
| 2        | <i>Sec</i>                         | <i>invA</i>                |
| 3        | <i>Sec</i>                         | <i>invA</i>                |
| 4        | <i>Sec</i>                         | <i>invA</i>                |
| 5        | <i>Sec</i>                         | -                          |
| 6        | <i>Sec</i>                         | -                          |
| 7        | <i>Sec</i>                         | -                          |

Bactérias *S. aureus* foram detectadas em todas as amostras de sashimi e sushi pela técnica de PCR. O gene *seC* codifica a enterotoxina C do *S. aureus*. As toxinas estafilocócicas (*ses*) são um grupo de enterotoxinas termoestáveis e resistentes ao pH gástrico. A enterotoxina C (*seC*) é dividida nos subgrupos C1, C2 and C3 e tem papel importante na causa de intoxicação alimentar (Argudin et al., 2010; Seo et al., 2010).

Cepas de *Salmonella entérica* foram detectadas nas amostras de sashimi 2, 3 e 4 pela técnica de PCR. O gene *invA* da *Salmonella* é responsável pela produção de proteínas que auxiliam a bactéria no processo de invasão de células epiteliais do hospedeiro. Esse gene contém sequências únicas para este gênero e foi provado como um alvo de PCR adequado com potencial aplicação diagnóstica (DE OLIVEIRA et al., 2013). A PCR com base no gene *invA* é simples, rápida, sensível e específica em comparação com o método tradicional (YAN et al., 2011).

## CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a qualidade microbiológica de sushis e sashimis comercializados em locais não especializados em culinária japonesa como supermercados e padarias na cidade de Brasília e região. Com relação à qualidade higiênicossanitária, todas as amostras (4 amostras de sashimi e 3 amostras de sushi) deste estudo estavam contaminadas com bactérias *S. aureus*, porém as contagens estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença desta bactéria indica principalmente falta de higiene da parte do manipulador, visto que esta é encontrada na pele e nas fossas nasais de seres humanos.

Os resultados mostraram que das 4 amostras de sashimi analisadas 3 amostras apresentaram *Salmonella* entérica (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*) e, portanto, estavam impróprias para o consumo. A *Salmonella* é um patógeno que pode ser introduzido na cadeia do pescado por meio da manipulação e higiene inadequada ou por contato do peixe com águas contaminadas. Por isso, a segurança microbiológica do pescado é uma preocupação dos consumidores, indústrias e das agências reguladoras em todo mundo, uma vez que o pescado é um importante produto para o comércio de alimentos, podendo ser um veiculador da transmissão de salmonelose para o homem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

AMAGLIANI, G; BRANDI, G; SCHIAVANO, G.F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research Internacional**, v.45, n.2, p.780-788, 2012.

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BRAGHINI, F. et al. Análise microbiológica de sashimisa base de salmão, comercializados na cidade de Maringá-PR quanto a presença de coliformes totais e termotolerantes, Anais Eletrônico IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, n. 9, p. 4-8, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.

CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Orgs.). Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, p. 742-750, 2006.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. *Salmonella* enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 16, p. 1947-1972, 2013.

ECHEVENGUA, M. M. et al. Qualidade da polpa da carpa Húngara transportada viva ou no gelo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 2004-2010, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

GATTI JUNIOR, P. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo.** 47 p. Tese de Mestrado, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GUIA, D. V. et al. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review, **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, p. e20180141, 2018.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

ICMSF. Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management.** New York: Kluwer Academic, 2002.

LIBRELATO, F. R.; SHIKIDA, S. A. R. L. Segurança alimentar: Um estudo multidisciplinar de qualidade do filé de tilápia comercializado no município de Toledo-PR. **Informe Gepec**, v. 9, n. 2, 2005.

LINDER, C. E. et al. *Salmonella* spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce. **Revista Higiene Alimentar**, v. 25, n. 192/193, p. 126-133, 2011.

MALAVOTA, L. C. M. et al. Ocorrência de *Vibriopara haemolyticus* e *Salmonella* spp. em “sashimis” comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 89-94, 2009.

MONTANARI, A. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes Japonês no município de Ji-Paraná - RO. **South American: Journal of Basic Education, Technical and Tchnological**, p. 4-16, 2015.

MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 3, n. 1701, p. 134-136, 2014.

PROENÇA, R. P. C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 4, 2010.

RODRIGUES, B. L. et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

SILVA, M. L.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 208-214, 2008.

YAN, L. et al. Comparison study of enrichment-PCR and traditional method for detection of *Salmonella* in poultry. **Journal of Hygiene Research**, v. 40, n. 3, p. 348-51, 354, 2011.

VALANDRO et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.



## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ASUAR, L. E. Guía práctica sobre la técnica de PCR. **Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología**, 574p., 2007

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1264-1270, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL. Ministério do Turismo. Governo do Brasil. **Brasil tem 1,5 milhão de cidadãos de origem japonesa**: Cidades brasileiras colonizadas por japoneses mantêm tradições nipônicas e são consideradas destinos turísticos. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/editoria/turismo/2017/06/brasil-tem-1-5-milhao-de-cidadaos-de-origem-japonesa>>.

CWIERTKA, K. J. From ethnic to hip: circuits of japanese cuisine in Europe. **Food and Foodways**, n. 13, v. 4, p. 241-272, 2005.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILLOTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, V. B.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteridis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango

contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

ECHEVENGUA, M. M. et al. Qualidade da polpa da carpa Húngara transportada viva ou no gelo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 2004-2010, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

HAMADA-SATO, N.; USUI, K.; KOBAYASHI, T.; IMATA, C., WATANABE, E. Quality assurance of rawfish base on HACCP concept. **Food Control**, v.16, p. 301-307, 2005.

HIRATA, M. **Influência da imigração japonesa na cozinha brasileira**. Disponível em: [http://www.ipk.org.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=61&Itemid=70](http://www.ipk.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=70)>.

IBGE, PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL. Rio de Janeiro: IBGE, v. 44, 2016. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf)>.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

LORENTZEN, G.; METTE, S.; BREILAND, W.; COOPER, M.; HERLAND, H. Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri sushi of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*). **Food Control**, v.25, p. 245-248, 2012.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular, **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010) **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por alimentos.**

Disponível

em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf)>

MONTANARI, A. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurantes Japonês no município de Ji-Paraná - RO. **South American: Journal of Basic Education, Technical and Tchnological**, p. 4-16, 2015.

MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 3, n. 1701, p. 134-136, 2014.

OLIVEIRA, T. W. N.; MARQUES, L. F. Avaliação das condições higiênico-sanitária no preparo de sushi e sashimi de um estabelecimento comercial. **Semiário de Visu**, v. 2, n. 1, p.194-201, 2012.

PATROCÍNIO, I. D. R. **A segurança alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de *sushi***. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2009.

POWLEDGE, T. M. The polymerasechainreaction. **Advances in Physiology Education**, v. 28, p. 44-50, 2004.

PROENÇA, R. P. C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 4, 2010.

RODRIGUES, B. L. et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A. de; REIS, D. R. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **LAJBM**, v. 2, n. 2, p. 54-81, 2011.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de *sushi* comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, Aracaju, v.8, n.3, 2012.

SILVA, M. L.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 3, p. 208-214, set. 2008.

TEODORO, V. A. M.; PINTO, M. C. D.; VANETTI, P. D.; BEVILACQUA, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, v. 58, n. 1, 9-14, 2006.

VALANDRO et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará, **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 9-14, 2007.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETO, N. S. E; SOUZA, O. V.; TÔRRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V. e col. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela; 2004.

YANO, Y.; YOKOYAMA, M.; SATOMI, M.; OIKAWA, H.; CHEN, S. S. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. **Journal of Food Protection**, n. 67, v. 8, p. 1617-1623, 2004.

#### 10. ANEXO 1. Visualização dos resultados da PCR em transiluminador sob luz violeta

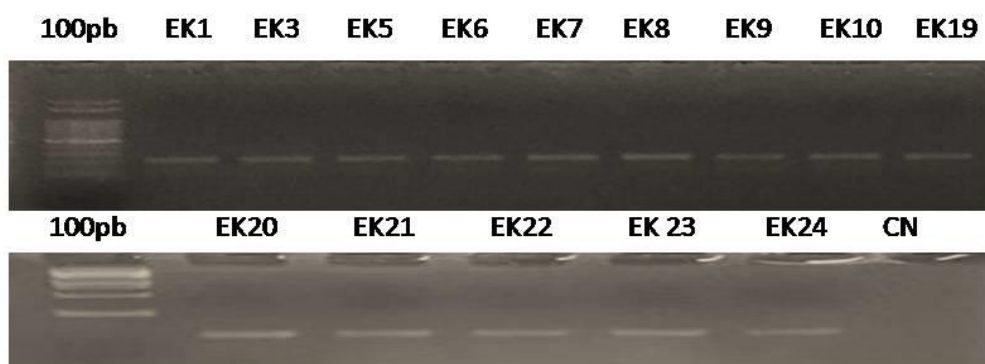


Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica*. M = marcador de 100 pb; EK1 a EK24 = amostras deste estudo com amplicons de *invA*(103 pb); CN = Controle Negativo.

## **11 ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point ou Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do programa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições

às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br).

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via *e-mail*.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail*

[autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)